

Evaluación indirecta de la contaminación del aire por una empresa que produce bioetanol, mediante índice estomático de *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) en barrio Parque San Antonio, Córdoba, Argentina

AGUILAR, Dana Lucía¹; FIAD, Federico ¹; JACQUAT, Andrés¹; MIGNOLA, Marcos ¹ y EDELSTEIN, Julio¹.

¹Cátedra de Problemática Ambiental – Facultad Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – Universidad Nacional de Córdoba

CP 5000 – Córdoba – Argentina

Email: aguilar.dana@gmail.com; Teléfono: +54(0351)156517339

Resumen

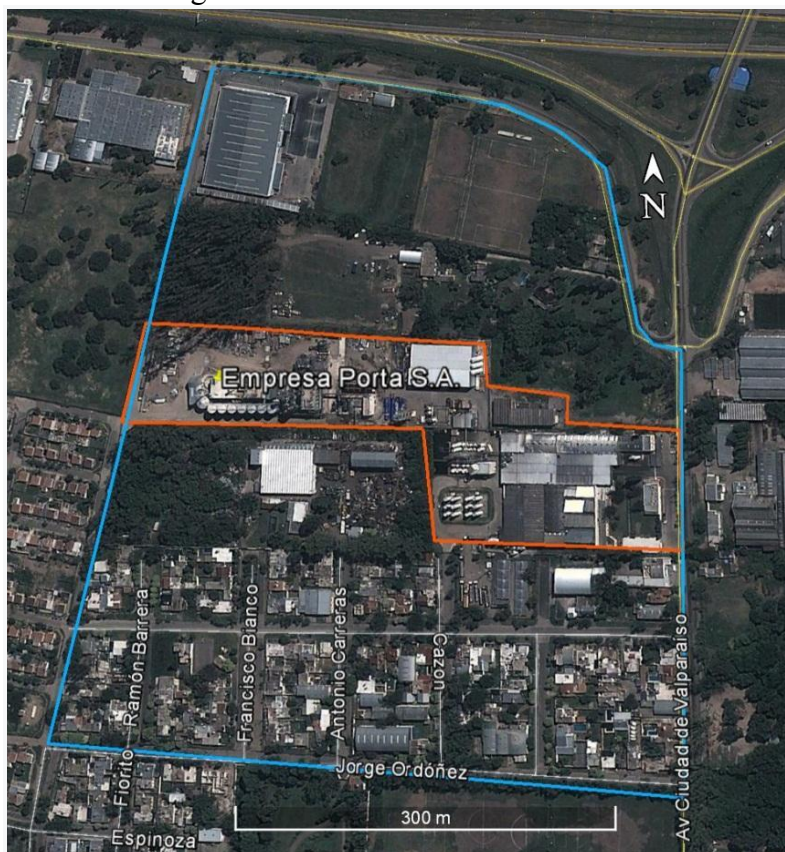
Debido a quejas de los vecinos del barrio Parque San Antonio, por malos olores en el ambiente y por diversos problemas de salud que comenzaron a detectarse en el año 2012, desde la puesta en marcha de la producción de bioetanol de la empresa Porta Hnos. S.A., se procedió a estudiar la posible presencia de contaminación de la atmósfera local. En la siguiente investigación se calcula el índice estomático (IE) en hojas de *Ligustrum lucidum* W. T. Aiton (siempreverde) en distintas zonas a fin de evaluar indirectamente si hay elevadas concentraciones de dióxido de carbono (CO₂) derivadas de la polución de la fábrica. Esto es debido a que las alteraciones atmosféricas provocan cambios en la micro-morfología de la epidermis foliar de esta especie perennifolia, respondiendo a ésta con la formación de más estomas, es decir, incrementando su IE. Para el estudio se seleccionaron tres zonas de muestreo que poseen alta, media y baja inmisión de contaminantes respectivamente, determinadas por el software Hybrid Single Particle Lagrangian Integrated Trajectory (HYSPLIT) de dispersión de pluma que simula la trayectoria y deposición de las emisiones de la empresa. Las muestras fueron obtenidas de la base de la copa de árboles adultos en el mes de mayo de 2014. Los datos obtenidos se compararon estadísticamente mediante el programa Infostat. Sobre la base de los resultados obtenidos, se concluye que es posible que, en el barrio estudiado, exista localmente una mayor concentración atmosférica de CO₂ ya que los valores del IE en la zona de alta

inmisión de contaminantes es de 20.47, el cual es significativamente diferente al IE de 16.69 correspondiente a la zona control. Al ser la empresa Porta Hnos. la única fuente emisora de este gas derivadas de su proceso de producción, es posible que dicha empresa sea la causante del fenómeno medido.

Palabras Clave: contaminación del aire, CO₂, índice estomático, *Ligustrum lucidum*, HYSPLIT.

Introducción

El barrio residencial Parque San Antonio, habitado desde hace 50 años aproximadamente, se encuentra ubicado en la periferia sur de la ciudad de Córdoba, Argentina, tras pasar la Avenida Circunvalación. En el año 1995, se instaló en el sector norte del barrio la empresa Porta Hnos. S.A. la cual fracciona y fabrica licores, después de que se incendiaron sus estructuras originales en barrio Alberdi. A partir del 2012, tras una ampliación en la cual sumó un total 5 hectáreas de superficie, comenzó con la producción de bioetanol a partir de la fermentación de maíz transgénico hasta la actualidad.



Mapa 1. Ubicación satelital de los límites barrio Parque San Antonio (marcado en celeste) y la empresa que produce bioetanol (naranja). Extraído de Google Earth®.

Según estudios realizados por la Red Universitaria de Ambiente y Salud -Reduas- (2013), vecinos del barrio comenzaron a percibir cambios en el ambiente, tales como olores extraños y desagradables, y empezaron a registrarse irritaciones oculares, dérmicas y respiratorias en los pobladores desde la puesta en marcha de la producción de bioetanol por parte de la empresa. Por tanto, en mayo de 2013 y a pedido de los vecinos, Reduas realizó un diagnóstico de la situación sanitaria y ambiental del barrio, en la cual concluyeron que, después de encuestar al 74% de los vecinos, más de la mitad de los pobladores estaban enfermos. Entre las afecciones más comunes registradas se detectaron conjuntivitis, cefaleas, trastornos respiratorios, gastritis y lesiones dérmicas, entre otras. Asimismo, otro de los síntomas registrados fue la dificultad para conciliar el sueño por parte de los vecinos, indicación típica de apunamiento o mal de las alturas, por falta de adaptación a una atmósfera con baja presión parcial de oxígeno. Para evaluar esta situación, midieron la fracción inspirada de oxígeno (FiO_2) en aire ambiental, técnica que mide el oxígeno en el aire atmosférico como porcentaje de la mezcla de todos los gases atmosféricos. Las mediciones durante el día fueron normales (FiO_2 de 21%), pero de noche los valores fueron entre el 18,5% y 20,2%, infiriendo que esta reducción en la concentración de oxígeno se debe a un aumento en la concentración de CO_2 .



Imagen 1, 2, 3 y 4. Fotos de viviendas pertenecientes al barrio Parque San Antonio. Esta última situación coincide con el cuestionamiento mundial actual sobre las plantas de bioetanol debido a que generan una elevada emisión de anhídrido carbónico (CO_2) que acentúa el calentamiento global y agrava el cambio climático. De acuerdo a la auditoría industrial realizada por la Dra. Liliana Martin y el ingeniero industrial Federico Gunderlin en 2012, Porta Hnos. S.A. al producir 100.000 litros diarios de bioetanol, genera la emisión gaseosa de 75.000 kg diarios de CO_2 . Esto se debe al proceso de fermentación, paso esencial para la producción de bioetanol. Durante el mismo, la fábrica libera altas

cantidades de dióxido de carbono, que a su vez, arrastra compuestos como etanal, metanal y acetato. Según datos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria –INTA– (Bragachini, Mario *et al.* 2011), la ecuación aproximada de la producción de Porta Hnos. S.A. es la siguiente:

Ingresa	Egresas
1000 kg. maíz	400 lts. etanol
2.680 l. agua	300 kg. burlanda
134,4 m ³ gas	300kg. CO ₂
	vinaza en cantidad no especificada

Tabla 1. Datos aproximados sobre la producción de Porta Hnos S.A. según el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Esta contaminación del aire produce alteraciones en la morfología y fisiología de las plantas. Se ha comprobado en estudios previos que el *Ligustrum lucidum* W.T. Aiton (Oleaceae) o siempreverde sirve como bioindicador de la contaminación atmosférica, en lo que respecta a modificaciones en la micro-morfología de sus hojas (Dottori, N. 2007). El efecto de los contaminantes produce la obturación de los estomas y la disminución de la fotosíntesis, entre otras alteraciones. Frente a estos problemas, la planta genera respuestas que dependen del tipo de contaminante, la concentración, como así el tiempo expuesto al mismo (Sharma & Butler, 1973). El CO₂ es uno de los factores que influyen en el índice estomático, actuando durante el desarrollo de estomas en la protodermis (tejido no diferenciado que da lugar a la epidermis) ya que es un regulador de la expresión génica durante la formación de los estomas. Dottori *et al.* en su trabajo sobre *L. lucidum* (2007) argumenta que esta especie al no tener tricomas protectores en sus hojas, por alteraciones morfológicas inducidas por contaminantes, permite que la presencia de material sólido suspendido obstruya los ostíolos. Frente a esta situación, la planta responde formando más estomas a fin de que no disminuya la tasa de intercambio de gases entre el mesófilo de la hoja y el medio externo, incrementándose de dicha manera el índice estomático (IE). Además, se considera al siempreverde como un buen ejemplar para este estudio dado que es perennifolio, crece naturalizado en las sierras de Córdoba (Argentina) y compite con las especies nativas.

El objetivo del presente trabajo es evaluar indirectamente la contaminación de aire por la empresa Porta S.A. en el barrio Parque San Antonio de la ciudad de Córdoba mediante la comparación del índice estomático de *Ligustrum lucidum* W.T. Aiton en distintas zonas (determinados por un modelo de deposición de contaminantes que se especificará a continuación). Se espera encontrar en barrio Parque San Antonio (Zona I), en las adyacencias de la fábrica Porta Hno. S.A., un mayor índice estomático (IE) puesto que se supone que es la zona con mayor concentración de CO₂ y en la que podría encontrarse material particulado, mientras que en áreas próximas al barrio en cuestión, como B° Inaudi

y B° Residencial San Antonio (Zona II), y en Ciudad Universitaria (Zona III), área control, valores de IE más bajos.

Métodos

Áreas de estudio

Se seleccionaron tres (3) zonas de estudio utilizando el modelo Hybrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory Model (HYSPLIT), el cual fue desarrollado por el Air Resources Laboratory de la Administración Nacional de Océanos y Atmósfera (NOAA) de Estados Unidos. El Servicio Meteorológico Nacional de los Centros Nacionales de Predicción Ambiental (NCEP) ejecuta una serie de análisis y previsiones de equipo operacional. NOAA's Air Resources Laboratory (ARL) utiliza habitualmente los datos del modelo del NCEP para el uso en el transporte aéreo de calidad y los cálculos de modelos de dispersión.

Los modelos de dispersión son métodos para calcular la concentración de contaminantes a nivel del suelo y a diversas distancias de la fuente. HYSPLIT arroja los resultados de dispersión de los contaminantes en forma de un gráfico simulando una pluma, entendiendo a esta última como la emanación visible de una chimenea. La información necesaria para realizar un modelo de dispersión incluye la ubicación del punto fijo de emisión (longitud y latitud), la cantidad y tipo de los contaminantes emitidos, condiciones de la emisión de la chimenea, altura de la chimenea, hora en que se realiza los muestreos y factores meteorológicos. Para los distintos parámetros se tuvieron en cuenta los siguientes valores:

- Latitud: 31°28'13.62" S; longitud: 64°11'25.8" O
- Hora de inicio de la emisión: desde 8.00 am hasta 20.00 pm
- Cantidad de contaminante: 300 kg/h
- Altura de la chimenea: 7 metros
- Condiciones de emisión: Gas

Se procedió a tomar doce (12) plumas en doce (12) horas, es decir, una pluma por cada hora, y se los importó al sistema de información geográfica Google Earth a fin de evaluar el tiempo de exposición de las zonas con respecto a todas las plumas obtenidas.

Las zonas fueron asignadas según las distintas concentraciones de deposición que se observaron en los resultados del modelo. La Zona I, representada por la región de mayor tiempo de deposición, que corresponde al Barrio Parque San Antonio; la Zona II, representada por la región de tiempo moderado de deposición, que corresponde al Barrio Inaudi y Barrio residencial San Antonio y; la Zona III, que corresponde al área fuera de la pluma, con nula deposición, que corresponde a Ciudad Universitaria.

Colecta del material

Una vez determinadas las zonas, se procedió a hacer un reconocimiento y relevamiento de todos los *Ligustrum lucidum* W. T. Aiton presentes, se enumeraron y con una tabla de números aleatorios se procedió a muestrear diez (10) árboles de *Ligustrum lucidum* de cada zona, de los cuales se tomaron diez (10) hojas de la base de la copa de cada árbol. Un total

de cien (100) hojas por zona. Se debe tener en cuenta que en la zona II, por tomar hacia ambos flancos de la zona de mayor deposición, se seleccionaron al azar cinco (5) árboles del Barrio residencial San Antonio -hacia la derecha- y cinco (5) árboles del Barrio Inaudi -hacia la izquierda-. Todas las muestras obtenidas se almacenaron dentro de bolsas plásticas en heladera hasta ser tratadas.

Índice estomático

Se procedió a la extracción de la epidermis abaxial aplicando la técnica de «peeling» (D' Ambrogio de Argüeso, 1993) con posterior eliminación de la clorofila, dejándola en un portaobjeto embebida con solución de hipoclorito de sodio al 50%. A continuación, se observó al microscopio de campo claro Carl Zeiss Primo Star binocular con grilla cuadrículada en aumento de 400X. Por hoja se tomó un único campo de 0.065025 mm². El cálculo del índice estomático (IE) [1] se realizó a través de la ecuación sugerida por Wilkinson (1979):

$$IE = (NE*100)/(CE+NE) \quad [1]$$

Donde,

IE = Índice estomático.

NE = Número de estomas por campo de observación.

CE = Número de células epidérmicas en el campo de observación.

Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó mediante el software estadístico Infostat, mediante un ANAVA en el cual se compararon los IE de cada zona a fin de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados

Luego de analizar trescientas (300) hojas de *Ligustrum lucidum* (100 hojas por zona), se promediaron los IE obtenidos por árbol -unidad muestral-. Es decir, se promediaron los datos de las diez (10) hojas que formaban parte de cada unidad muestral y se obtuvo un único dato por árbol. Una vez obtenidos, para dar una idea general de los resultados preliminares respecto a las diferencias de IE por zona, se realizó un promedio de los datos de la muestra total de diez (10) árboles por zona y se obtuvo la siguiente tabla:

Características de la hoja	ZONA		
	Zona I	Zona II	Zona III
	Bº Parque San Antonio	Bº Inaudi y Bº residencial San Antonio	Ciudad Universitaria
Promedio Índice estomático en cara <u>abaxial</u> de las UM	20,47	19,31	16,69

Tabla 2. Promedio de los índices estomáticos de *L. lucidum*, correspondientes a los 10 unidades muestrales (UM) que corresponden a las zonas I, II y III.

A continuación, se realizó la comparación de las medias obtenidas mediante software Infostat, en cual se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) a fin de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos de las tres zonas. Al comprobar que los datos no cumplían con el supuesto de homocedasticidad (homogeneidad de varianza), requisito para la implementación válida del modelo de análisis, se procedió a realizar un ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis para un nivel de significación del 5% ($p \leq 0.05$). Se obtuvieron los siguientes resultados:

VARIABLE	p
Índice estomático en cara abaxial	0,0355*

Tabla 3. Comparación de índice estomático de la hoja de *L. lucidum* en distintas zonas, por análisis de varianza no paramétrico (Kruskal Wallis) para un $p < 0.05$.

* Diferencias estadísticamente significativas.

Al obtener un nivel de significación menor del 5% se considera que hay diferencias significativas entre las zonas, por lo que se realizó un Test de Duncan a fin de identificar cuáles eran las áreas que tenían mayor diferencia respecto a sus medias. Se obtuvo que la zona I (A) difiere significativamente de las zonas II y III (B), situación plasmada en el siguiente gráfico:

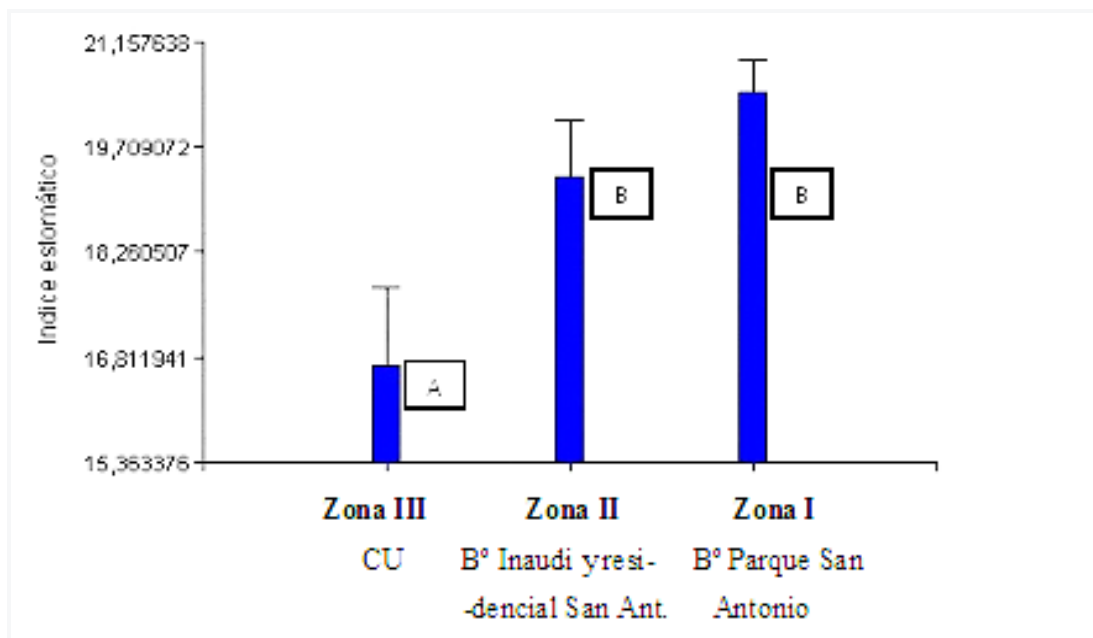
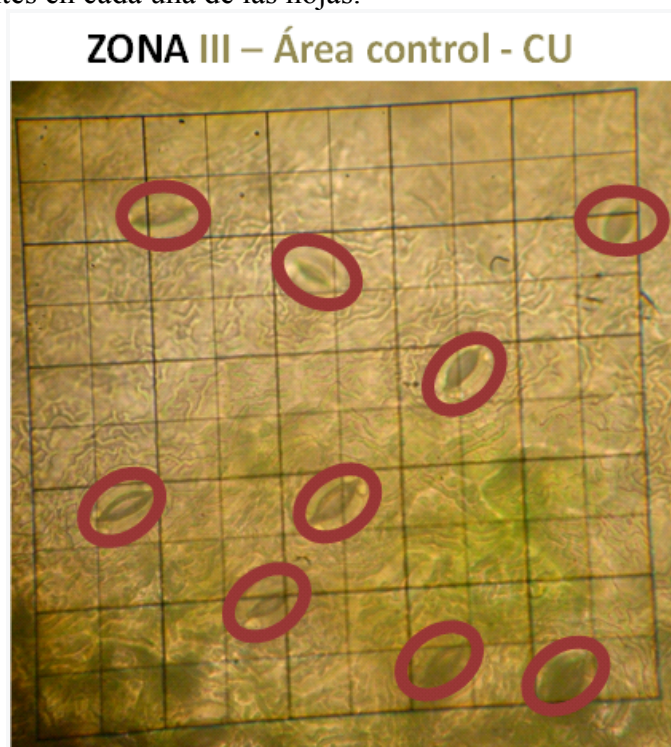


Gráfico 1. Diferencias entre los índices estomáticos promedios de cada zona analizada y su error asociado.

A continuación se presenta gráficamente la frecuencia de estomas obtenidas en las áreas de mayor y menor deposición de contaminantes, a modo de reflejar los datos obtenidos. No obstante, se debe recordar que el cálculo de IE se pondera con la cantidad de células epidérmicas presentes en cada una de las hojas.



ZONA I – B° Parque San Antonio

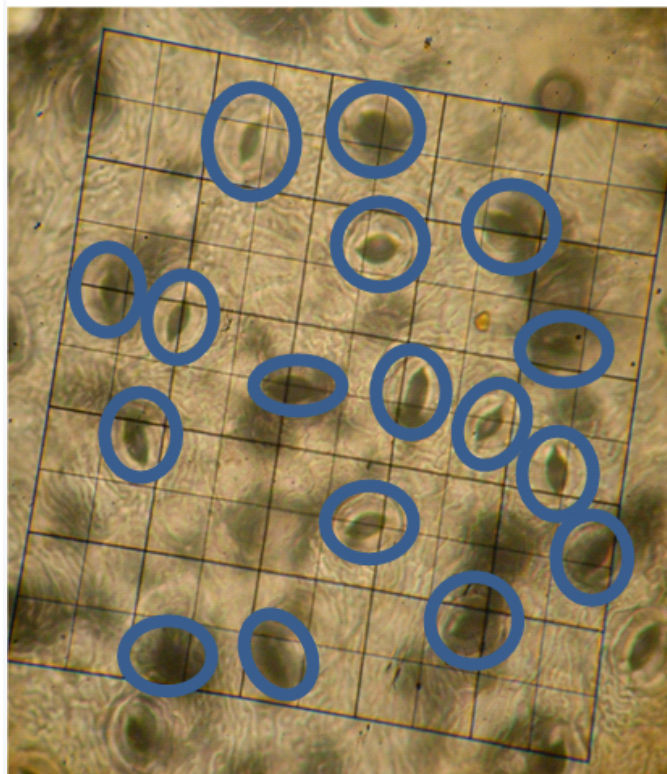


Imagen 5 y 6. Frecuencia de estomas en zona III, correspondiente al sitio de menor deposición (área control, Ciudad Universitaria) y en la zona I, de mayor deposición, (B° Parque San Antonio).

Conclusión

Se concluye que en el B° Parque San Antonio de la ciudad de Córdoba hay una atmósfera contaminada con concentraciones de dióxido de carbono superiores a los parámetros normales, ya que el IE en la Zona I, considerada como el área de mayor deposición, dio valores superiores al de la Zona III, área control. Se considera que la Zona II, sitio de deposición intermedia, no se obtuvieron diferencias significativas con la Zona I puesto que por la deriva de la pluma, la inmisión de los contaminantes cae directamente en los sectores intermedios, constituyéndolas como áreas de deposición principal. No obstante, se considera importante remarcar que no se puede afirmar que la contaminación presente en el barrio sea a causa de la empresa Porta Hnos. S.A., pero es posible que ésta sea la causante del fenómeno observado ya que es la única fuente emisora de este gas en altas cantidades derivadas de su proceso de producción.

Discusión

Según los cálculos de índice estomático (IE) en hojas de *Ligustrum lucidum* W. T Aiton (Oleaceae), se han detectado valores relativamente superiores en la zona I (B° Parque San Antonio), en comparación con los valores arrojados en las zonas II (B° Inaudi y B°

Residencial San Antonio) y III (Ciudad Universitaria). Es decir, en el área que se supone contaminada con elevadas concentraciones de CO₂, presenta valores de IE relativamente altos. Lo observado se condice con los resultados de Dottori, N. *et al.* (2007, B) en un estudio previo que realizaron con la misma especie de árbol y en la misma ciudad, donde se comprobó que en calles céntricas muy transitadas (zona poluta) el IE dio más elevado que un zona no poluta o control, fuera de la ciudad. Resultados similares fueron expuestos en un estudio con la especie *Eucalyptus obliqua* Decne (Scarr, Mark Jordan. Tesis 2011).

El CO₂ es uno de los factores que influyen en el índice estomático, actuando durante el desarrollo de estomas en la protodermis (tejido no diferenciado que da lugar a la epidermis) ya que es un regulador de la expresión génica durante la formación de los estomas. Además, el IE está determinado por la estrategia de vida de la especie (historia de vida específica) o evolución, edad ontogénica de la hoja, estructura de la hoja, estado fisiológico y disponibilidad de agua y también está muy afectado por la presencia en el ambiente de material particulado microscópico, como el hollín producto de la mala combustión de motores (Scarr, Mark Jordan. Tesis 2011).

Si bien se conoce que las alteraciones atmosféricas provocan cambios en la micro-morfología de la epidermis foliar (el IE por ejemplo), no se conoce una uniformidad de dichos cambios entre las distintas especies de plantas puesto que éstas responden de distintas maneras para enfrentar dicha alteración (Scarr, Mark Jordan. Tesis 2011). Por ejemplo, a continuación se cita una lista de especies arbóreas que responden de manera inversa a lo que lo hace nuestra especie de estudio, disminuyendo su IE en presencia de contaminantes: *Cassia speciosa* Schrad (Fabaceae) (Dottori et al (2007, A), *Populus deltoide* W. Bartram ex Marshall (Salicaceae), *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex Hook (Salicaceae) (Jiang X. N. *et al.* (1995)), *Cassia siamea* Lam. (Fabaceae), *Cassia glauca* Lam. (Fabaceae) (Joshi O. P. *et al.* (2008)), *Acacia melanoxylon* R. Br. (Fabaceae), *Acmena smithii* (Poir.) Merr. & L.M.Perry (Myrtaceae) (Scarr, Mark Jordan (tesis, 2011). * No obstante, se está de acuerdo con la discusión proporcionada por Dottori *et al.* en su trabajo sobre *L. lucidum* (2007) en la que argumenta que esta especie al no tener tricomas protectores en sus hojas, por alteraciones morfológicas inducidas por contaminantes, permite que la presencia de material sólido suspendido obstruya los ostíolos. Frente a esta situación, la planta responde formando más estomas a fin de que no disminuya la tasa de intercambio de gases entre el mesófilo de la hoja y el medio externo, incrementándose de dicha manera el IE. Por estas razones, se infiere que en la atmósfera local de la zona II de nuestro estudio también hay un tipo de material en suspensión, lo que explicaría el incremento del IE observado.

Al evaluar las observaciones, se concluye que en el B° Parque San Antonio de la ciudad de Córdoba, posiblemente hay concentraciones de dióxido de carbono superiores que fluctúan durante el día como lo expone Reduas (2013) por el fenómeno de inversión térmica, incrementando su concentración durante la noche o probablemente por emisiones oscilantes de la empresa. Por otro lado, también es posible que haya emisiones de material particulado microscópico que obture los ostíolos de los estomas. Estas conjeturas explicaría el aumento del IE en hojas de *Ligustrum lucidum* W.T. Aiton en la zona I.

Consideramos relevante tener en cuenta que, si bien se cree que el IE de *L. lucidum* es una buena técnica para evaluar contaminación ya que es fácil, rápida y muy económica, se deben sumar otras técnicas a la presente investigación para confirmar o no la presencia de

material particulado en suspensión a fin de observar si interfiere con el valor IE, y otras técnicas para evaluar presencia o no de etanol y/o metanol en la atmósfera para determinar si es efectivamente la empresa Porta Hnos. S.A. la que contamina.

En síntesis, se demuestra contaminación atmosférica local por dióxido de carbono y partículas en suspensión. Pero nuestros resultados no son válidos para determinar la causalidad de las enfermedades de las personas en el barrio, ni tampoco para determinar que la contaminación efectivamente es provocada por Porta Hnos. S.A.

NOTA: *nombres botánicos consultados y corregidos desde: The International Plant Names Index (<http://ipni.org/> visitada el 12/06/2014)

Agradecimientos

-Al profesor Julio Edelstein, de la Cátedra de Problemática Ambiental de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales perteneciente a la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), por su guía en la confección de este trabajo de investigación.

-A la cátedra de Morfología Vegetal de la UNC por permitirnos trabajar en su laboratorio y brindarnos las herramientas necesarias para la realización de este trabajo. Especialmente, a Verónica Cabrera y Andrea Cortez por orientarnos dentro del mismo y contribuir con sus observaciones y conocimiento.

-Al profesor Mariano Grilli, por sus aportes respecto al análisis y utilización de los modelos estadísticos.

Bibliografía

- Bala, C. & Raina, A. K. (2011). Effect of vehicular pollution on *Duranta repens* L. in Jammu City. *Journal of Applied and Natural Science* 3 (2): 211-218 (2011).
- Bragachini, Mario, Casini, Cristiano; Saavedra, Alejandro, Ustarroz, Fernando; Errasquin, Lisandro; y Bragachini, Marcos. (2011) Informe de visita a la futura planta de bioetanol a base de maíz de Bio 4 SA. INTA PRECOP. Oct. 2011 <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/agoindustrializacion/Informe-Visita-Futura-Planta-Bioetanol.pdf> (29/05/2014)
- Dottori, N.; Bruno, G.; Stiefkens, L.; Hadid, M.; Liscovsky, I.; Cosa, M. T. (2007). *Efecto de la contaminación ambiental en la anatomía de la hoja de Ligustrum lucidum (Oleaceae)*. Bol. Soc. Argent. Bot. 42 (3-4): 231 - 236. 2007.
- Dottori, N; Stiefknes, L; Bruno, G.; Hadid, M.; Delbon, M. y Cosa, M. T. (2007). *Alteraciones histológicas en las hojas de Ceiba speciosa (Bombacaceae), producidas por la contaminación ambiental*. Arnaldoa 14(1): 71- 76.

- Jiang, X. N.; Ceulemans R. & Van Preat L. (1995). Effects of CO₂ enrichment, leaf position and clone on stomatal index and epidermal cell density in poplar (*Populus*). *New phitol.* (1995), 131, 99-107.
- Joshi, O. P.; Tiwari, S.; Syed, K. and Sika, J. (2008). Air pollution induced changes in foliar morphology of two species of cassia at indore city (india). *Journal of Environmental Research And Development* Vol. 2 No. 3, January-March 2008.
- Martinez, I. (2014). Termodinámica básica y aplicada. <http://webserver.dmt.upm.es/~isidoro/bk3/c15/Combustion.%20Caracteristicas.pdf> (12/07/2014)
- Martin, Liliana y Guderlin, Federico. (2012) Auditoria Industrial de Porta Hnos. S.A., octubre 2012.
- Ronchi, S.; Ávila Vázquez, M.; Dozzo, G.; Ruderman, L.; Ponce, M.; Quattrino, G. y Miranda, C. (2013-A). Red Universitaria de Ambiente y Salud (REDUAS). Análisis de la Salud Colectiva Ambiental de Barrio Parque San Antonio. Impacto en la Salud Colectiva por aparente contaminación de una planta de Bioetanol. Informe preliminar Córdoba, 10 de Agosto 2013.
- Ronchi, S.; Ávila Vázquez, M.; Dozzo, G.; Ruderman, L.; Ponce, M.; Quattrino, G. y Miranda, C (2013-B). Red Universitaria de Ambiente y Salud (REDUAS). Plantas de Bioetanol a partir de maíz transgénico. Como funcionan, como contaminan y sus efectos en la salud.
- Scarr, Mark Jordan (2011). *The use of stomatal frequency from three Australian evergreen tree species as a proxy indicator of atmospheric carbon dioxide concentration*. A thesis submitted to the Office of Post-Graduate Research as a requirement for the award of Doctor of Philosophy, Victoria University 2011.
- Sharma, G. K. & Butler, J. (1973). *Leaf cuticular variations in Trifolium repens L. as indicators of environmental pollution*. *Environm. Pollut.* 5: 287-293.
- Snow A. A.; Case A. L. & Curtis P. S. (1998). Heritable variation in stomatal responses to elevated CO₂ in wild radish, *Raphanus raphanistrum* (brassicaceae). *American Journal of Botany* 85 (2): 253-258. 1998.